



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

**Efecto sinérgico antifúngico del extracto etanólico foliar de
Azadirachta indica con el fluconazol sobre *Candida albicans*.
Estudio in vitro.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Médico Cirujano

AUTORA:

Loyola Gil, Maricielo (ORCID: 0000-0001-6659-8955)

ASESORES:

DRA.Chian García, Ana María (ORCID: 0000-0003-0907-5482)

MG. Polo Gamboa, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles
TRUJILLO - PERÚ

2020

Dedicatoria

A:

Dios, mi familia, especialmente a mi querida madre Socorro, cuyo apoyo incondicional me ha permitido lograr mis metas, a mis amigos, en especial a Magy y a mis maestros.

Agradecimiento

Agradezco en primer lugar a Dios por darme las fuerzas para lograr mis metas, a mi familia por su constante apoyo y fe en mí, a mis amigos, en especial a Magy por haberme ayudado a motivarme y cumplir este proyecto, y finalmente gracias a mis queridos maestros cuyas enseñanzas y orientación han permitido que logre culminar este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimiento.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	4
II. MARCO TEÓRICO	6
III. METODOLOGÍA:	15
3.1. Tipo y diseño de investigación:.....	15
3.2. Variables y operacionalización:	15
3.3. Población, muestra y muestreo	15
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	16
3.5. Procedimiento:	16
3.6. Métodos de análisis de datos:	17
3.7. Aspectos éticos:.....	17
IV. RESULTADOS:.....	19
VI. CONCLUSIONES	27
VII. RECOMENDACIONES	28
REFERENCIAS:	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos descriptivos del efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> , solo y con fluconazol sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231:.	19
Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> , fluconazol y la asociación de ambos	20
Tabla 3. Prueba de comparación dos a dos (post hoc) Prueba t de la mínima diferencia significativa que compara los efectos antifúngicos del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 100%, fluconazol 25 µg y la asociación de ambos.....	21

ÍNDICE DE GRÁFICOS Y FIGURAS

Gráfico 1. Gráfico de medias agrupadas de los efectos antifúngicos del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> al 100%, fluconazol 25 µg y la asociación de ambos:	22
--	----

RESUMEN

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto sinérgico antifúngico del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25µg sobre *Candida albicans* ATCC 10231, in vitro, mediante el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, siguiendo los criterios establecidos por el CLSI. Luego de evaluar las propiedades antifúngicas del extracto etanólico de *Azadirachta indica*, sólo y en combinación con fluconazol, se encontró que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* inhibió el crecimiento fúngico de 13.80 ± 1.5 mm y en sinergia con el fluconazol obtuvo 25.90 ± 1.2 mm, en comparación con el fluconazol de 22.10 ± 1.5 mm. Este estudio concluyó que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* combinado con el fluconazol ejerce efecto sinérgico antifúngico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, el cual fue superior al efecto del fluconazol solo.

Palabras clave: Agentes antifúngicos, *Candida albicans*, *Azadirachta indica*.

ABSTRACT

This study was performed with the objective of evaluating the synergistic antifungal effect of the association of the ethanolic extract of *Azadirachta indica* 100% with fluconazole 25 µg on *Candida albicans* ATCC 10231, in vitro, using the Kirby-Bauer agar diffusion method and following the criteria established by the CLSI. In this experimental study, it was evaluated the antifungal properties of the ethanolic extract of *Azadirachta indica*, alone and in combination with fluconazole. It was found that the ethanolic extract of *Azadirachta indica* had an antifungal effect of 13.80 ± 1.5 mm of inhibition zone and in synergy with fluconazole it obtained 25.90 ± 1.2 mm, in comparison with fluconazole alone, that obtained as inhibition zone 22.10 ± 1.5 mm. It was concluded that the ethanolic extract of *Azadirachta indica* combined with fluconazole exerts a synergistic antifungal effect on strains of *Candida albicans* ATCC 10231, which was superior to the effect of fluconazole alone.

Key words: Antifungal agents, *Candida albicans*, *Azadirachta indica*.

I. INTRODUCCIÓN

Los importantes avances en terapéutica antifúngica han permitido tratar las numerosas afecciones de etiología fúngica que cada año aquejan a la población. Sin embargo, resulta preocupante la resistencia que van adquiriendo cada día los agentes etiológicos fúngicos, convirtiéndose en una nueva problemática de salud pública que llega a afectar a nivel mundial.¹

En la presente década, se han ido incrementando la incidencia de infecciones por hongos, la resistencia a los fármacos así como la letalidad. En cuanto a la letalidad que se asocia a las infecciones por hongos, ésta puede alcanzar hasta el 90 %, mientras que en las septicemias, se ha reportado una letalidad de 20 % a 50 % de los casos cuando son causadas por especies del género *Candida*.¹

Las infecciones ocasionadas por especies de *Candida* son causas importantes de morbilidad y pueden variar desde infecciones locales a sistémicas de acuerdo a la localización y vía de diseminación. La especie que con mayor frecuencia es la responsable de la candidemia es la *Candida albicans*. Se calcula que anualmente a nivel mundial la candidiasis invasiva afecta a cerca 250 mil personas, con una incidencia de 2-14 casos por cada 100000 habitantes.²

Un estudio importante fue realizado en nuestro país en pacientes inmunosuprimidos y se llegó a estimar 581174 casos de infecciones fúngicas, de los cuales 1557 fueron causados por especies de *Candida*. En cuanto a su incidencia, se llegó a estimar en la ciudad de Lima, de 1,18 a 2,6 casos por cada 1000 hospitalizaciones.¹

Por otro lado, los avances médicos han mejorado la supervivencia de pacientes graves, aumentando así el riesgo de sufrir una infección por hongos. Se estima que de los pacientes que se encuentran hospitalizados,

más de un 5% pueden desarrollar una infección intrahospitalaria y de la cual, aproximadamente el 5% podría estar causada por *Candida*.³

El uso indiscriminado de los triazoles en las últimas tres décadas ha creado resistencia en uno de los productos más representativos en ese grupo como es el fluconazol, ocasionadas por su posología y disponibilidad, se mencionan que cerca de una decena de especies de *Candida* han reportado resistencia al fluconazol, entre las que se incluye la *Candida albicans*, que va desde el 1 al 6%, según un estudio publicado en el 2016 y que su aumento en la farmacoresistencia continua.⁴

Una gran porción de la población sigue acudiendo a la medicina tradicional como primera o única opción para tratar las enfermedades o molestias que padecen. De acuerdo a cifras estimadas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta práctica alcanzaría un ochenta por ciento aproximadamente. En el caso de las infecciones de etiología fúngica, una de las plantas que se ha usado desde tiempos inmemorables en la India es la *Azadirachta indica* o mejor conocida como Neem o flor de la India.⁵

Lo cual nos lleva a plantearnos el siguiente problema ¿la asociación del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25 µg tiene efecto sinérgico antifúngico sobre la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans* en un estudio in vitro?

Después de conocer la realidad problemática en nuestro medio, ante la presencia de resistencia a los fármacos antifúngicos, se hace más evidente la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas, especialmente en la fitoterapia, por tal motivo se consideró investigar el efecto fungicida de la *Azadirachta indica* sobre uno de los hongos más comunes que afectan al ser humano como es la *Candida albicans*.

Gran parte de los fármacos que se dispone en la actualidad ocasionan toxicidad, más aún si es prolongado su consumo y muchas veces

desencadena resistencia. Se escogió estudiar a la *Azadirachta indica* por constituir una planta medicinal, con propiedades fungicidas y fungistáticas. Dicha comparación se realizará con el fluconazol, principio activo de uso mundial y frecuente.

La información recabada en esta investigación resultará útil, en primer lugar porque el trabajo ayudará a confirmar el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de neem y en segundo lugar se establecerá que tan efectivo es al comparar el efecto fungicida de dicha planta con el fluconazol. El beneficio se traducirá en la posibilidad de difundir los resultados y que tan factible será para industrializarlo en el escenario farmacéutico.

Para responder al problema, se plantearon la siguiente hipótesis: “La asociación del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25 µg sí tiene efecto sinérgico antifúngico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 en estudio in vitro.”

El objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto sinérgico antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25µg sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 en un estudio in vitro. Además, se plantean los siguientes objetivos específicos: Establecer el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, medir el efecto antifúngico del fluconazol 25 µg sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 y establecer el efecto sinérgico antifúngico de la asociación del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25µg sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

II. MARCO TEÓRICO

Diversos estudios han sido realizados en relación al efecto antifúngico de la *Azadirachta indica*.

Imran H, et al. (Bangladesh, 2020) condujeron un ensayo experimental con el fin de comparar el potencial antifúngico del extracto etanólico de neem sobre cepas de *Candida albicans*. Prepararon el extracto etanólico de neem a 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL. Utilizaron la difusión en agar Sabouraud para calcular las zonas inhibitorias de los extractos. Obtuvieron como halo inhibitorio mayor al del grupo con extracto etanólico foliar de neem a 20 mg/mL: 29.8 ± 0.50 .⁶

Faleh I, et al. (India, 2020) estudiaron la eficacia antifúngica del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* sobre cepas de *C. albicans*. Prepararon el extracto etanólico de neem al 25% y al 12.5% y utilizaron la difusión en agar Sabouraud para calcular los halos inhibitorios de los extractos correspondientes y del grupo control. Hallaron los siguientes halos de inhibición: en el grupo con extracto etanólico foliar de neem al 25%: 12 ± 0.18 mm, en el grupo con extracto etanólico foliar de neem al 12.5%: 7 ± 0.21 mm y para el grupo control: 4 ± 0.18 mm. Concluyeron que el extracto etanólico foliar de neem al 25% ejerció el mayor efecto antifúngico sobre las cepas *C. albicans*.⁷

Shetty B, et al. (India, 2019) compararon la actividad antifúngica del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* y *M. oleífera* sobre cepas de *C. albicans*. Prepararon el extracto etanólico foliar de neem al 20% y utilizaron la difusión en agar Sabouraud como medio de cultivo en donde calcularon los halos inhibitorios de los extractos correspondientes y del grupo control. Encontraron los siguientes halos de inhibición: en el grupo con extracto etanólico foliar de neem al 20%: 15.75 ± 0.707 mm, siendo superior al de la otra planta. De acuerdo al estudio, concluyeron que el extracto etanólico foliar de neem al 20% ejerció el mayor efecto antifúngico sobre las cepas *C. albicans*.⁸

Bansal V, et al. (India, 2019) evaluaron en su estudio la eficacia antifúngica del extracto acuoso de neem comparado con clorhexidina al 0.2% sobre *C. albicans*. Prepararon extracto acuoso foliar de neem al 50% y se usó la

difusión en agar Sabouraud, donde calcularon el halo de inhibición para establecer la actividad antifúngica. Hallaron que la zona de inhibición promedio del extracto de neem fue 5.8 ± 4.3 mm mientras que de la clorhexidina fue 14.4 ± 5.55 mm. Concluyeron que el efecto antifúngico del extracto acuoso foliar del neem fue menor que la clorhexidina.⁹

Philip J, et al. (India, 2018) condujeron un estudio in vitro con el fin de establecer la eficacia antifúngica del extracto etanólico de *Azadirachta indica*, de *Melia azedarach* y de *Spilanthes acmella* sobre cepas ATCC 10231 de *C. albicans*. Utilizaron la difusión de disco para medir la zona inhibitoria y así determinar la eficacia antifúngica. Encontraron que el extracto etanólico de neem al 0.1% tuvo un halo inhibitorio de 5.3 mm mientras que el de extracto al 0.5% obtuvo 6 mm, siendo superior al de las otras especies. En conclusión, determinaron que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* tuvo la mayor eficacia antifúngica.¹⁰

Ambhore S, et al. (India, 2017) estudiaron en un ensayo comparativo la acción antifúngica del extracto foliar de neem al 10% y el hipoclorito de sodio sobre *Candida albicans* in vitro. Prepararon extracto etanólico al 10% y midieron su actividad antifúngica al calcular las zonas de inhibición de los inóculos de *C. albicans*. Obtuvieron como resultado que al cabo de un día, tanto el extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* y el NaOCl impidieron el desarrollo de la *C. albicans* con zonas de inhibición promedios de 6.5 ± 0.13 mm y 7.2 ± 0.23 mm, respectivamente. En conclusión, hallaron que el extracto etanólico de neem fue ligeramente inferior al NaOCl.¹¹

Barua D, et al. (India, 2017) realizaron un estudio in vitro experimental donde evaluaron el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de neem al 7.5% y al 15% en comparación con ketoconazol, nistatina y diacetato de clorhexidina sobre cepas ATCC 10231 de *C. albicans*. Obtuvieron como resultado que tanto el ketoconazol como la nistatina (al 10%) mostraron una inhibición máxima promedio de 31.75 ± 0.45 mm seguidos del extracto etanólico de neem al 15% con una inhibición promedio 20.67 ± 0.49 mm y

por último del diacetato de clorhexidina al 10% cuya inhibición promedio fue de 18.33 ± 0.49 mm, al cabo de 24 horas sobre las cepas de *C. albicans*. Concluyeron que el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* fue superior al diacetato de clorhexidina pero inferior al de los antifúngicos comunes.¹²

Beraldo J, et al. (Brasil, 2015) ejecutaron un ensayo experimental con el fin de determinar la acción antifúngica de extractos crudos de *Azadirachta indica* sobre cepas ATCC 10231 de *C. albicans*. Los extractos fueron preparados utilizando etanol al 70 %, etil acetato y hexano. Para poder medir la concentración inhibitoria mínima en placas, se utilizó el método de Microplate Alamar Blue Assay. Se obtuvo como resultado que el único extracto que logró inhibir el desarrollo de *C. albicans* fue el de etil acetato con una concentración de 2000 µg/mL.¹³

Arumugam P, et al. (Malasia, 2015) condujeron un ensayo con el fin de establecer la acción antifúngica de los extractos acuosos y etanólicos de *Azadirachta indica* sobre *Candida albicans*. Prepararon distintas concentraciones de los extractos a 50 g/ml, 25 g/ml, 12.5 g/ml, 6.25 g/ml y 3.125g/mL. Utilizaron la difusión en agar Sabouraud. Encontraron que el halo de inhibición promedio para el extracto acuoso a 50 mg/mL fue de 29.80 ± 0.84 mm, mientras que la del extracto etanólico a 50 mg/mL fue de 33.00 ± 0.71 mm. Concluyeron que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* ejerce mayor acción antifúngica sobre *C. albicans* que el extracto acuoso.¹⁴

Salazar O, et al. (Colombia, 2015), condujeron un ensayo in vitro con el fin de medir la eficacia antifúngica de la *Azadirachta indica* sobre especies dermatofíticas. Se comparó con el antimicótico terbinafina. Obtuvieron como resultado la inhibición total del crecimiento de las cepas aisladas y las concentraciones inhibitorias mínimas para los extractos metanólicos de hojas y semillas, siendo el intervalo de 50 µg/mL a 200 µg/mL y entre 625 µg/mL a 2500 µg/mL, respectivamente. En conclusión, demostraron que el

extracto metanólico foliar tiene eficacia antifúngica mayor que el de las semillas al tener una CIM menor.¹⁵

Srinidhi S, et al (India, 2014) realizaron un ensayo in vitro con el fin de establecer la eficacia antifúngica del extracto foliar de neem, del NaOCl al 3% y de clorhexidina al 2% sobre *Candida albicans*. Prepararon extracto etanólico foliar de Neem. Para medir la eficacia antifúngica recurrieron a la difusión en agar y la medición de los halos inhibitorios. En cuanto a los resultados, los halos de inhibición promedio para la *Azadirachta indica*, el NaOCl y la clorhexidina fueron 16.33 mm, 19.66 mm y 8.66 mm, respectivamente. Concluyeron que la eficacia antifúngica del extracto etanólico de neem es comparable a NaOCl al 3% y significativamente superior a la clorhexidina al 2%.¹⁶

Tyagi S, et al. (India, 2013) realizaron un ensayo in vitro donde compararon la eficacia antifúngica del extracto alcohólico de neem y NaOCl al 5% sobre *Candida albicans*. Midieron la eficacia antifúngica a través del conteo digital de colonias. Obtuvieron como resultado que la eficacia antifúngica del extracto alcohólico de neem es inferior al NaOCl al 5%.¹⁷

Dutta A, et al. (India, 2013) condujeron un estudio in vitro donde evaluaron el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de neem en comparación con clorhexidina al 0.2% sobre cepas ATCC 10231 de *C. albicans*. Se realizó un estudio experimental. La técnica usada fue la difusión en disco y se realizaron 5 repeticiones por grupo. Obtuvieron como resultado que el extracto etanólico foliar de neem tuvo una zona de inhibición promedio del 17.8 mm mientras que la clorhexidina al 0.2% tuvo una zona promedio de 15.8 mm. Concluyeron que el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de neem fue superior a la clorhexidina al 0.2%.¹⁸

Reyes D, et al (Venezuela, 2013) evaluaron la eficacia antimicótica in vitro del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* del 5 al 80% en *Candida albicans*. Determinaron la concentración mínima fungicida (CMF) en 50 µl

de *C. albicans* a 37°C al cabo de las 24 y 48 horas. En cuanto a la actividad antimicótica del extracto etanólico foliar de neem, encontraron que tiene un efecto fungistático parcial a las 24 horas, su concentración inhibitoria mínima es al 30% y su efecto fungicida se alcanza con una concentración de 35%.¹⁹

Mahmoud D, et al. (Egipto, 2011) condujeron un ensayo in vitro para evaluar la eficacia antifúngica de extractos de hojas de Neem y de nimolol sobre algunos patógenos humanos importantes, entre ellos *Candida albicans*. Prepararon diferentes concentraciones de estos extractos (5, 10, 15 y 20%) que inhibieron el crecimiento de los patógenos y el efecto aumentó gradualmente con la concentración. Se encontró que el extracto etil acetato de Neem al 20% logró la mayor inhibición de cepas de *C. albicans* y los otros patógenos en comparación con los otros extractos a la misma concentración.

20

Herrera C. (Trujillo, 2019), evaluó la eficacia antifúngica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* sobre cepas ATCC 10231 de *C. albicans* contrastado con el antifúngico Fluconazol. Desarrollaron una investigación experimental, considerándose 10 repeticiones por cada grupo. El método fue con posprueba con grupo control. Se halló que la zona de inhibición con el fluconazol fue de 31.70 mm + 1.30 mm. Concluyó que el efecto inhibitorio antifúngico de la canela y el fluconazol fue alto, así como de la canela sola contra la *Candida albicans*.²¹

El Neem, cuyo nombre científico es la *Azadirachta indica*, se conoce comúnmente como la “lila de la India” o “Margosa”; pertenece a la familia Meliaceae, subfamilia Meloideae y a la tribu Meliae. La *Azadirachta indica* ha sido utilizada con fines medicinales por varias culturas. La *Azadirachta indica* es un árbol de crecimiento rápido comúnmente encontrado en la India y en países tropicales del continente africano y americano. Ha sido utilizado en la medicina ayurvédica por más de 4000 años debido a sus propiedades medicinales. El Neem (*Azadirachta indica*) es considerado inocuo para los

seres humanos, animales, insectos y lombrices de tierra y se encuentra aceptado para su empleo en cultivos alimenticios.²²

La *Azadirachta indica* contiene varios componentes como la nimbina, nimbidina, nimbolida y limonoides que participan en el manejo de enfermedades a través de la modulación de diversas vías genéticas entre otras acciones. La quercetina y el β -sitosterol fueron los primeros flavonoides polifenólicos purificados a partir de las hojas frescas de neem y se conoce que poseen actividad antifúngica y antimicrobiana.²²

Todas las partes de la *Azadirachta indica* (raíz, tallo, hojas, semillas y las flores) que contienen aceite esencial muestran diversas propiedades medicinales y que tradicionalmente se usan para tratar un gran número de enfermedades. Esta planta posee más 140 principios activos con propiedades insecticidas, antiinflamatorias, antiulcerosas, antipiréticas, antiartríticas, antifúngicas, antimaláricas, antibacterianas, antitumorales, inmunomoduladoras, espermicidas, diuréticas, etc.²³

El neem es rico en triterpenoides, algunos de ellos conocidos como limonoides, son tetranotriterpenoides, un grupo de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados con grupos hidroxilo, de los cuales el compuesto más conocido es la azadirachtina. Otros compuestos similares son la salanina, nimbina, 3-desacetilsalanina y 6-desacetilnimbina. Estos triterpenoides se suelen extraer al moler las semillas de neem y agregándoles hexano y alcohol para separarlos del aceite.²⁴

Diversos estudios proponen como mecanismo de acción que los extractos de las plantas actúan sobre células fúngicas a nivel de la síntesis de la pared celular. Se sabe que algunas plantas son capaces de inhibir la síntesis de quitina. Además, se ha reportado que el extracto acuoso de neem puede incrementar la hidrofobicidad de la membrana en *C. albicans*. En cuanto a la acción del extracto metanólico de las semillas de neem así como la azadirachtina pura, éstos son capaces de inhibir la biosíntesis de ergosterol,

la hipótesis más aceptada sería la relacionada a la inhibición de la enzima responsable: la 14 α -demetilasa.²⁴

El fluconazol es uno de los antifúngicos más usados para tratar infecciones por *Candida*. Este fármaco es un antifúngico triazólico perteneciente a la familia de los azoles. Los azoles actúan inhibiendo el citocromo P450 de la enzima 14 α -demetilasa, que es parte la vía de síntesis del ergosterol. Dicha enzima es codificada por el gen ERG11. Más específicamente, el átomo libre de nitrógeno del anillo azólico se une a un átomo de hierro en el grupo hemo de la enzima, lo que evita la activación del oxígeno y por consiguiente la demetilación de lanosterol, que a su vez inhibe el proceso de síntesis de ergosterol. Al ser este un componente primordial en la membrana celular de los hongos, esta inhibición resulta tóxica para el hongo porque se acumulan esteroides metilados en la membrana y el crecimiento celular se detiene. Debido a su mecanismo de acción, el fluconazol es considerado como un fungistático.²⁵

Los mecanismos de resistencia probables para los azoles que se plantean actualmente son: la modificación de la enzima diana y concentraciones inadecuadas del fármaco al llegar al lugar de acción debido a cambios en la permeabilidad de la membrana o por sistemas que se encargarían de bombear activamente el fármaco fuera de la célula. En los azoles el primer mecanismo consiste en una disminución de la expresión del gen ERG11 que codifica la 14 α -demetilasa, mientras que otro mecanismo propuesto consideraría la mutación del gen ERG11 que a su vez afecta en su estructura o función; lo cual podría ser inducido por un mecanismo de regulación a la baja de la síntesis de dicho gen debido a la exposición prolongada al fluconazol.¹

Candida spp existe como comensal en la piel, boca y el tracto gastrointestinal. Colonizan las mucosas de todos los humanos al nacer, por lo que el riesgo de infecciones endógenas se mantiene presente. Su crecimiento y diseminación es regulado por la flora microbiana con la que

coexisten, las barreras epiteliales intactas y el sistema inmune innato. Aunque la *Candida spp* es parte de la flora normal del cuerpo humano, también posee la habilidad de convertirse en patógeno y causar infecciones. La especie *Candida albicans* es la más frecuentemente aislada en cultivos y se caracteriza por adoptar una forma oval, producir hifas y pseudohifas.²⁶

III. METODOLOGÍA:

3.1. Tipo y diseño de investigación:

Tipo de investigación: Básica.

Diseño de investigación: Experimental puro, con posprueba y grupo control.²⁷

Se consideró el esquema siguiente:

RG ₁	X ₁	O ₁
RG ₂	X ₂	O ₂
RG ₃	X ₃	O ₃
RG ₄	X ₄	O ₄

En donde:

RG₁₋₄: Grupos de cepas de *C. albicans* ATCC 10231

X₁: Fluconazol 25µg + extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100%

X₂: Extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100%

X₃: Fluconazol 25 µg (control positivo)

X₄: DMSO – Dimetil Sulfóxido (control negativo)

O₁₋₄: Efecto antifúngico (zona de inhibición).

3.2. Variables y operacionalización:

3.2.1. Variable independiente: Agente antifúngico

- Agente no farmacológico: Extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100%
- Agente farmacológico: Fluconazol 25 µg

3.2.2. Variable dependiente: Efecto antifúngico

- Con efecto antifúngico: zona de inhibición ≥ 19 mm
- Sin efecto antifúngico: zona de inhibición < 19 mm

Operacionalización de variables. (Anexo 3)

3.3. Población, muestra y muestreo

Población: Para el estudio se incluyó a todos los especímenes de la cepa ATCC 10231 de la especie *Candida albicans* cultivados.

Criterios de selección:

- **Criterios de inclusión:** Especímenes de *Candida albicans* ATCC 10231 puros que fueron cultivados en agar Sabouraud por 48 horas a 35 – 37 °C de temperatura.
- **Criterios de exclusión:** Especímenes de *Candida albicans* ATCC 10231 contaminados.

Muestra: Se utilizaron 10 repeticiones por cada grupo de estudio, teniendo en total 40 repeticiones.

Tamaño de muestra: Para la selección de la muestra se consideró la fórmula estadística de la comparación de dos medias y la estimación que existe entre ellas. (Anexo N°4)

Muestreo: Se utilizó el muestreo no probabilístico.

Unidad de análisis: Cada repetición realizada en cada placa Petri con la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Unidad de muestreo: Estuvo constituida por cada repetición realizada en cada placa Petri con la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1. Técnica: Se utilizó la observación directa del crecimiento fúngico en las placas Petri de *Candida albicans* ATCC 10231.

3.4.2. Instrumento de recolección de datos: Se utilizó una ficha de recolección de datos. (Anexo N°5)

3.5. Procedimiento²⁸:

Se procedió con los siguientes pasos:

- a) Se realizó la identificación taxonómica de *Azadirachta indica* en el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo. (Anexo N° 6)
- b) Se obtuvo el extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% mediante la técnica de maceración. (Anexo 7)
- c) Se cultivó al hongo *Candida albicans* ATCC 10231 en el medio de agar Sabouraud.
- d) Se utilizó el método de difusión de disco en agar de Kirby-Bauer modificada con hoyos, con el fin de evaluar la susceptibilidad microbiana de las cepas ATCC 10231 de *C. albicans*, según lo establecido por el Estándar M44-A2 del CLSI.²⁹

3.6. Métodos de análisis de datos:

La información recolectada fue ingresada en la base de datos del programa estadístico SPSS versión 25, la información fue detallada en las tablas y se representó gráficamente mediante el diagrama en escalera. Para el análisis de los datos obtenidos se aplicaron las estadísticas descriptivas: promedios y desviación estándar en los casos correspondientes. Con el propósito de comparar el efecto de cada tratamiento antifúngico considerando el halo inhibitorio se utilizó el ANOVA. Se realizó la prueba post hoc de la mínima diferencia significativa con el propósito de establecer cuál de ellos tiene mayor efecto.²⁷

3.7. Aspectos éticos:

Para realizar este proyecto se aplicaron las normas de bioseguridad de laboratorio establecidas por el Ministerio de Salud. Además, se contó con la aprobación del proyecto de tesis por parte del Comité de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo.³⁰

Es importante resaltar que en este estudio se respetaron los principios de ética estipulados en el código de ética del Colegio Médico del Perú,

especialmente el Cap. 6 art 48 y se respeta la biodiversidad de la *Azadirachta indica*.^{31 32}

IV. RESULTADOS:

Tabla 1. Datos descriptivos del efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de *Azadirachta indica*, solo y con fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231:

Tratamiento	Nº repeticiones	Media	DE*	Desv. Error	95% del IC para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Ext. Etanólico de <i>A. indica</i> (1)	10	13.80	1.476	.467	12.74	14.86	11	16
Ext. Etanólico de <i>A. indica</i> + fluconazol (2)	10	25.90	1.197	.463	25.30	26.92	24	28
Fluconazol (3)	10	22.10	1.449	.458	21.06	23.14	20	24
DMSO (4)	10	0.00	0.000	.000	0	0	0	0

*DE: Desviación estándar

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* no ejerce efecto antifúngico sobre *Candida albicans* al tener un halo inhibitorio de 13.80 ± 1.5 mm. En cambio la sinergia con fluconazol sí tiene efecto antifúngico 25.90 ± 1.2 mm, en comparación con el fluconazol cuyo resultado fue 22.10 ± 1.4 mm.

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de *Azadirachta indica*, fluconazol y la asociación de ambos

	Suma de cuadrados	gl*	Media cuadrática	F	Sig.**
Entre grupos	757.852	2	378.926	207.899	P < 0.01
Dentro de grupos	47.389	26	1.823		
Total	805.242	28			

*gl: Grados de libertad

**Sig. : Significancia

Con las hipótesis de prueba:

H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu$

H1: Al menos una difiere.

Según el análisis de varianza se puede evidenciar que los resultados son significativos porque el valor de $P < 0.01$.

Tabla 3. Prueba de comparación dos a dos (Post hoc) Prueba t de la mínima diferencia significativa que compara los efectos antifúngicos del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100%, fluconazol 25 µg y la asociación de ambos.

Tratamientos que se comparan		Diferencia de medias	Desviación Estándar	Significación estadística
1	2	-12,100*	0.534	0.000
	3	-8,300*	0.534	0.000
	4	13,800*	0.534	0.000
2	1	12,100*	0.534	0.000
	3	3,800*	0.534	0.000
	4	25,900*	0.534	0.000
3	1	8,300*	0.534	0.000
	2	-3,800*	0.534	0.000
	4	22,100*	0.534	0.000
4	1	-13,800*	0.534	0.000
	2	-25,900*	0.534	0.000
	3	-22,100*	0.534	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Al aplicar la prueba post hoc, se puede evidenciar que los resultados son diferentes entre sí.

H0: $\mu_i = \mu_j$

H1: $\mu_i \neq \mu_j$ (donde $i = 1, 2, 3, 4$)

En todos los casos $p < 0.01$ (es decir que todas difieren entre sí).

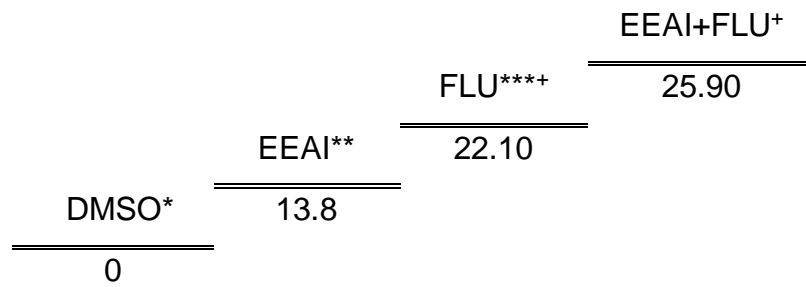


Gráfico 1. Gráfico de medias agrupadas de los efectos antifúngicos del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100%, fluconazol 25 µg y la asociación de ambos:

Fuente: Ficha de recolección de datos

* DMSO: Dimetil sulfóxido

** EEAI: Extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100%

*** FLU: Fluconazol 25 µg

+: Tiene efecto antifúngico al ser > 19 mm.

Se puede evidenciar que la asociación del extracto etanólico de *Azadirachta indica* y el fluconazol ejercen el mayor efecto antifúngico entre los cuatro grupos comparados.

DISCUSIÓN

El presente estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100%, del fluconazol 25µg así como de la asociación de ambos sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 en un estudio in vitro. Para evaluar dicho efecto, se midió el halo inhibitorio y se comparó con el estándar de sensibilidad establecido por el CLSI para levaduras.

En la Tabla 1 se evidencia que el resultado del extracto etanólico del *Azadirachta indica* sólo, es inferior que el de la asociación con fluconazol sobre *Candida albicans*, obteniéndose halos inhibitorios de 13.80 ± 1.47 mm y 25.90 ± 1.19 mm, respectivamente. Por otro lado, en cuanto al efecto del fluconazol, este tuvo una zona inhibitoria de 22.10 ± 1.44 mm, la cual es menor al efecto cuando se encuentra asociado al extracto etanólico de *Azadirachta indica*. Además, se constató que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* también posee efecto antifúngico cuando se expuso a las cepas de *Candida albicans*, obteniéndose halos inhibitorios con valores mayores al rango de referencia del Instituto de estándares para el laboratorio clínico (29), (19mm) para considerar como sensible (eficaz) frente a este hongo.

En cuanto a la sinergia antifúngica de la asociación del extracto etanólico de *Azadirachta indica* y fluconazol, se obtuvo el halo inhibitorio de 25.90 ± 1.19 mm, cuyo valor es superior al encontrado por Saini et al. (33), cuyo estudio también evaluó el efecto sinérgico antifúngico de la asociación del extracto hexano foliar de *Azadirachta indica* al 60% y una preparación de gel de fluconazol, el resultado que obtuvieron fue de 16 mm. La diferencia entre los halos obtenidos podría deberse al uso de un solvente diferente y a la concentración menor que fue empleada. Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de tener un valor inferior al del presente estudio, el halo inhibitorio de la sinergia fue mayor al de la *Azadirachta indica* sola, que fue de 14 mm.

El efecto antifúngico obtenido por la sinergia del extracto etanólico de *Azadirachta indica* y fluconazol fue de 25.90 ± 1.19 mm, el cual fue superior a los resultados de las investigaciones de Faleh et al. (7) y de Das et al. (34), quiénes hallaron valores promedio de 12 mm. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que dichos estudios utilizaron concentraciones de extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25% y 30%, respectivamente, que fueron comparadas con concentraciones menores y a un grupo control, por lo que la diferencia en resultados podría deberse a la menor concentración que utilizaron. Asimismo, el resultado del halo de inhibición promedio hallado por Bohora et al. (35), 7.1 mm, también es inferior al obtenido por el presente estudio, esto puede deberse al haberse utilizado una concentración del 25%.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con los estudios de Imran (6) y Arumugam (14), se demuestra que fueron inferiores a los valores puesto que sus investigaciones obtuvieron halos inhibitorios de 29.8 mm y 33 mm, respectivamente. Es importante resaltar que dichos estudios utilizaron concentraciones de 20% y 50%, respectivamente, lo cual resulta relevante porque a pesar que usaron concentraciones menores que las de la presente investigación, estos obtuvieron resultados mayores.

También es importante tomar en cuenta el tipo de extracto utilizado, por ejemplo, en el caso de Swapna (36), Bansal (9) y Arumugam (14), los tres realizaron investigaciones empleando extractos acuosos de *Azadirachta indica* al 50% y obtuvieron los siguientes halos inhibitorios: 3 mm, 5.8 mm y 29.8 mm, respectivamente. A pesar de la diferencia entre los resultados, el encontrado por Arumugam sigue siendo mayor a la sinergia de *Azadirachta indica* y fluconazol encontrada en el presente estudio. Por otra parte, autores como Falana et al. (37) y Akpuaka (38) utilizó extractos hexánicos de *Azadirachta indica* al 100% y obtuvieron zonas inhibitorias de 9 mm y 28 mm, respectivamente. La obvia diferencia en resultados, siendo la de Akpuaka ligeramente mayor a la obtenida por el presente estudio, podría deberse al tipo de solvente utilizado, mientras que Falana empleó hexano, Akpuaka utilizó n-hexano, además, las técnicas de extracción fueron distintas en cuanto al tiempo de maceración.

Por otro lado, la parte de la planta empleada para hacer el extracto puede influir en el resultado. El presente estudio empleó las hojas para realizar el extracto, en cambio en el estudio de Autade (39), se utilizó la corteza de la *Azadirachta indica* y acetona como solvente y obtuvo como halo inhibitorio mayor 13 mm, siendo inferior al del presente estudio. Este valor podría deberse a la parte que se utilizó para preparar el extracto así como el solvente empleado, puesto que distintas partes de la misma planta podrían tener composiciones fitoquímicas distintas. Otro estudio como el de Swapna et al. (40), utilizó las semillas de *Azadirachta indica* y como solventes al fluido de dióxido de carbono supercrítico y metanol al 30%, obteniendo un halo inhibitorio promedio de 16 mm, siendo inferior también al del presente estudio.

La diferencia de los resultados obtenidos en comparación a los previamente mencionados se debería en mayor medida a la gran variabilidad de la composición química de la *Azadirachta indica*. Existen múltiples factores que influyen en la composición y rendimiento del extracto etanólico, entre ellos se consideran la estación del año, el origen geográfico, la genética, el tiempo de recolección, el clima y la composición del suelo del área de muestreo, además de las etapas de crecimiento de la planta, lo que hace que la composición química del extracto etanólico de la misma especie sea diferente en la cantidad y tipos de metabolitos secundarios. (26)

El extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias e insecticidas. Estas propiedades se deben principalmente a sus derivados fenólicos. Entre estos compuestos se encuentra el nimolol, un componente con actividad antifúngica, el cual es uno de los elementos principales del extracto etanólico de *Azadirachta indica*. Esta sustancia actúa desnaturalizando proteínas y reacciona con los fosfolípidos de la membrana celular de las células fúngicas. Además, se ha propuesto otro mecanismo de acción del nimolol, que afecta no solo a la membrana sino también a la envoltura de las células fúngicas. (24)

Entre las limitaciones de este estudio puede considerarse el tipo de hongo utilizado, *Candida albicans* ATCC 10231, el cual es sensible a los azoles por lo que se espera que haya efecto antifúngico al ser enfrentado a fluconazol, sin embargo, la *Candida albicans* resistente a fluconazol sería más apropiada para evaluar la sinergia del extracto etanólico de *Azadirachta indica* y fluconazol, ya que se podría comparar tanto con el extracto solo como con el mismo fluconazol. Otra limitación de este estudio es el haber utilizado solo el extracto etanólico de las hojas de *Azadirachta indica* en lugar de comparar distintas partes de la planta como las semillas, corteza o frutos, los cuales aún no cuentan con muchos estudios a diferencia de las hojas.

Entre las fortalezas de este se encuentra el haber trabajado con la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, la cual es certificada y cumple con los estándares del CLSI, por lo cual es idónea para evaluar el efecto de agentes antifúngicos. Por otro lado, otra fortaleza importante a resaltar es el haber podido obtener la planta de la zona de Piura, lugar donde abunda la *Azadirachta indica* al reunir las condiciones climáticas apropiadas para su desarrollo.

Los resultados de este estudio permitirán a otros investigadores el poder ampliar el conocimiento sobre el efecto antifúngico de la sinergia de la *Azadirachta indica* con fluconazol, así como su uso potencial como adyuvante en la terapia antimicrobiana en infecciones fúngicas.

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% no tiene efecto inhibitorio del crecimiento sobre *Candida albicans* ATCC 10231.
- El fluconazol 25 µg ejerce efecto antifúngico sobre *Candida albicans* ATCC 10231.
- La asociación del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25µg tiene efecto inhibitorio del crecimiento sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones que estudien otras asociaciones de antifúngicos con el extracto etanólico de *Azadirachta indica*.

Realizar estudios que evalúen el efecto antifúngico del extracto etanólico de *Azadirachta indica* contra otros patógenos, en especial con cepas de hongos resistentes a los antifúngicos convencionales.

Realizar estudios de los componentes fitoquímicos de los especímenes de *Azadirachta indica* para establecer los quimiotipos correspondientes.

Realizar estudios que utilicen otras técnicas para evaluar el efecto antifúngico de *Azadirachta indica*.

Realizar estudios que evalúen el efecto antifúngico de *Azadirachta indica* en modelos animales para establecer el comportamiento de los fitoquímicos en dichos modelos.

REFERENCIAS:

1. Zurita Macalupú S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 23 de marzo de 2018; 35(1):126. [Citado: 2019 julio 25]; 35(1):126-31. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v35n1/a19v35n1.pdf>
2. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 15 de agosto de 2017; 216(suppl_3):S445-51. [Citado: 2019 julio 25]; 216(S3):S445–51. Disponible en: https://academic.oup.com/jid/article-abstract/216/suppl_3/S445/4107052
3. Peman J, Canton E, Quindos G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*. 1 de mayo de 2012;67(5):1181-7. [Citado: 2019 julio 25]; 67:1181–1187. Disponible en: <https://academic.oup.com/jac/article/67/5/1181/980498>
4. López-Ávila K, Dzúl-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Bioméd [Internet]*. 5 de septiembre de 2016 [citado 25 de julio de 2010]; 27(3). Disponible en: <http://revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/541>
5. World Health Organization, editor. WHO global report on traditional and complementary medicine, 2019. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2019. 226 p. [citado: 2020 mayo 15]. Disponible en: <https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/WhoGlobalReportOnTraditionalAndComplementaryMedicine2019.pdf?ua=1>
6. Hina Imran, Tehmina Sohail, Atiq Rehman, Wasif Iqbal, Nudrat Fatima, Maria Shakir. A comparative study of four indigenous medicinal plants of Pakistan against some oral pathogens. *Bangladesh J Med Sci [Internet]*. 16 de enero de 2020 [citado 15 de mayo de 2020]; 19(2). Disponible en: <https://www.banglajol.info/index.php/BJMS/article/view/45009>

7. Ayed S, Faleh I, F. Atshan O. The role of Neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extracts on the murine experimentally infected with Candidiasis The role of Neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extracts on the murine experimentally infected with Candidiasis. Trop J Pharm Res. 19 de mayo de 2020; 11:890-6. [citado: 2020 abril 15]; 11:890. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/339512244_The_role_of_Neem_Azadirachta_indica_ethanolic_extracts_on_the_murine_experimentally_infected_w
ith_Candidiasis](https://www.researchgate.net/publication/339512244_The_role_of_Neem_Azadirachta_indica_ethanolic_extracts_on_the_murine_experimentally_infected_with_Candidiasis)
8. Shetty B. Assessment of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica* leaves against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* - an in vitro study. Int J Adv Res. 31 de julio de 2019; 7(7):742-8. [citado: 2020 mayo 15]; 7(7). Pp. 742-748. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/9418>
9. Bansal V, Gupta M, Bhaduri T, Shaikh SA, Sayed FR, Bansal V, et al. Assessment of Antimicrobial Effectiveness of Neem and Clove Extract Against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*: An In vitro Study. Niger Med J J Niger Med Assoc. 2019;60(6):285-9. [Citado: 2020 abril 15]; 60(6):285–289. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7053276/>
10. Philip J, Mahalakshmi K. Antimicrobial effect of three Indian medicinal plant extracts on common denture plaque bacteria. Drug Invent Today. 2019;11(3):3. [Citado: 2020 mayo 15]; 11(3):575–7. Disponible en: <http://jpr solutions.info/files/final-file-5c866a31e8e966.03176183.pdf>
11. Ambhore S, Sapna S & Vikas A. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of 5% sodium hypochlorite solution (as an intracanal irrigant) and 10% neem leaves extract against infected root canal microbial isolates with special reference to *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. An in vitro study. Indian J Med Res Pharm Sci. 28 de septiembre de 2017;4(9):52-61. [Citado: 2019 agosto 08]; Disponible en: <http://www.ijmrps.com/Issues%20PDF/Vol.4/September-2017/10.pdf>
12. Barua D, Basavanna J, Varghese R. Efficacy of Neem Extract and Three Antimicrobial Agents Incorporated into Tissue Conditioner in Inhibiting the

- Growth of *C. Albicans* and *S. Mutans*. J Clin Diagn Res JCDR. mayo de 2017;11(5):ZC97-101. [citado: 2020 mayo 15]; 11(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483820/pdf/jcdr-11-ZC97.pdf>
13. Beraldo JI, Bernardi N de O, Meurer M, Costa GM, Arantes VP. Estudo da atividade antifúngica de extratos vegetais de *Azadirachta indica* frente a cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 10231. Arq Ciênc Saúde UNIPAR [Internet]. 8 de septiembre de 2015 [citado 08 de agosto de 2019];19(1). Disponible en: <https://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/5261>
 14. Arumugam PA, Mohamad I, Salim R, Mohamed Z. Antifungal Effect of Malaysian Neem Leaf Extract on Selected Fungal Species Causing Otomycosis in vitro Culture Medium. 2015;11:16. [citado: 2019 agosto 08]; 11(2):69–84. Disponible en: https://medic.upm.edu.my/upload/dokumen/FKUSK1_Final_Article_8.pdf
 15. Salazar O, Iván D. Actividad antifúngica del extracto crudo de *Azadirachta indica* A. Juss. de suspensión de células sobre hongos dermatofitos causantes de enfermedades patógenas al hombre. 24 de junio de 2019 [citado 25 de julio de 2020]; Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10839>
 16. Raghavendra S, Balsaraf K, Raghavendra S, Balsaraf K. Antifungal efficacy of *Azadirachta indica* (neem) - An in vitro study. Braz J Oral Sci. Setiembre de 2014;13(3):242-5. [Citado: 2019 julio 25]; 13(3): 242-245. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S16772252014000300242&lng=en
 17. Tyagi S, Sinha D, Garg P, Singh U, Mishra C, Nagpal R. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. J Conserv Dent JCD. 2013;16(6):532-5. [Citado: 2019 julio 25]; 13(3): 242-245. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842722/>
 18. Dutta A, Kundabala M. Antimicrobial efficacy of endodontic irrigants from *Azadirachta indica*: An in vitro study. Acta Odontol Scand. 1 de noviembre de

- 2013;71(6):1594-8. [citado: 2020 abril 15]; 71:6, 1594-1598. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00016357.2013.780290?journalCode=iode20>
19. Reyes de Fuentes D, Fernández Da Silva R. Efecto biocida in vitro del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus* sp y *Pseudomonas* sp. Salus. Diciembre de 2013;17(3):34-41. [Citado: 2019 julio 25]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-713820130003000006&lng=es
20. Mahmoud D, Hassanein N, Youssef K, Abou Zeid M. Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. Braz J Microbiol. 2011;42(3):1007-16. [Citado: 2019 julio 25]; 13(3): 242-245. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768785/>
21. Herrera C. Efecto antifúngico del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Candida albicans* atcc 10231, comparado fluconazol, 25 ug, estudio in vitro. Univ César Vallejo [Internet]. 2019 [citado 07 de setiembre de 2019]; Disponible en: <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/29774>
22. Bijauliya RK, Alok S, Chanchal D, Sabharwal M, Deo RC, Yadav. An updated review of pharmacological studies on *Azadirachta indica* (neem) [Internet]. 2018 [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: [/paper/AN-UPDATED-REVIEW-OF-PHARMACOLOGICAL-STUDIES-ON-Bijauliya-Alok/fb2174cbfebe5dc71f630990f6dfa3975f467c0f](#)
23. Lakshmi T, Krishnan V, Rajendran R, Madhusudhanan N. *Azadirachta indica*: A herbal panacea in dentistry – An update. Pharmacogn Rev. 2015;9(17):41-4. [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4441161/>
24. Saleem S, Muhammad G, Hussain MA, Bukhari SNA. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. Phytother Res PTR. julio de

- 2018;32(7):1241-72. [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29671907/>
25. Ruiz-Pérez NJ, Arriaga-Alba M, Ocharán-Hernández ME, Sánchez-Navarrete J, Pérez-Cruz E, Rodríguez-Wong U, et al. Aspectos farmacocinéticos del fluconazol. *Rev Hosp Jua Mex* 2013; 80(1): 28-33. [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2013/ju131f.pdf>
26. Rathod T, Padalia H, Chanda S. Anticandidal and synergistic anticandidal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* and *Azadirachta indica* essential oils. *Journal Of Pharmacy*. [Publicación periódica en línea] 2017. [citado: 2019 agosto 01]; 7: 52-71. Disponible en: <http://iosrphr.org/papers/vol7-issue9/K0709015271.pdf>
27. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación. 2014.
28. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* [Internet]. 2015 [citado 13 de diciembre de 2020]; 04(03). Disponible en: <http://www.omicsgroup.org/journals/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.php?aid=58448>
29. Alexander BD, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. 2017.
30. Protocolos de seguridad en laboratorios UCV. 26 de abril de 2018;(02):33. [Citado: 2020 abril 26]. Disponible en: https://www.ucv.edu.pe/datafiles/TRANSPARENCIA/ACTAS/2017/ANEXO%2001%20RD-0010-2018-UCV_1.pdf
31. Ortiz Cabanillas P. Acerca del Código de Ética y Deontología del Colegio Médico del Perú: fundamentos teóricos. *Acta Médica Peru*. enero de

- 2008;25(1):46-7. [citado: 2017 Jun 2]. Disponible en: http://cmp.org.pe/wpcontent/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf
32. [PDF] Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos | Semantic Scholar [Internet]. [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Declaraci%C3%B3n-de-Helsinki%2C-principios-y-valores-en-en-Ruggiero/92eca4cca48f6f15180c690c575bd9b3f0572835>
33. Saini A, Saini G, Singh B, Vyas M, Verma S, Prakash O. Synergistic effect of *Azadirachta indica* and *Curcuma longa* with fluconazole gel against *Candida albicans*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research [Internet]. 2019 [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://ijpsr.com/bft-article/synergistic-effect-of-azadirachta-indica-and-curcuma-longa-with-fluconazole-gel-against-candida-albicans/?view=fulltext>
34. Das L, Godbole SS, Marg N. Antifungal and Phytochemical Analysis of *Lantana camara*, *Citrus limonum* (Lemon), *Azadirachta indica* (Neem) and *Hibiscus rosasinensis* (China Rose) [Internet]. 2015 [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: </paper/Antifungal-and-Phytochemical-Analysis-of-Lantana-Das-Godbole/70b066b8c03070e645142281f3cd2c983bfcae50>
35. Bohora A, Hegde V, Kokate S. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extract and 2% sodium hypochlorite against *E. faecalis*, *C. albicans* and mixed culture -An in vitro study. Endodontology. 30 de noviembre de 2009; 22. [citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/267935540_Comparison_of_the_antibacterial_efficiency_of_neem_leaf_extract_and_2_sodium_hypochlorite_against_E_faecalis_C_albicans_and_mixed_culture_-An_in_vitro_study
36. Swapna S, Sulthana I, Savithri M, Mungara S, Manipal M, Rajmohan D, et al. Comparative evaluation of the antifungal efficacy of six different plant extracts and their synergistic effect against *Candida albicans*: An in vitro study. SRM J Res Dent Sci. 17 de octubre de 2020;9. [Citado 13 de diciembre de 2020].

Disponible

en:

https://www.researchgate.net/publication/344712394_Comparative_evaluation_of_the_antifungal_efficacy_of_six_different_plant_extracts_and_their_synergistic_effect_against_Candida_albicans_An_in_vitro_study

37. Falana M, Nurudeen Q. Analysis of secondary metabolites and in vitro evaluation of extracts of *Carica papaya* and *Azadirachta indica* leaves on selected human pathogens. Not Sci Biol. 31 de marzo de 2020; 12:57-73. [Citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: [340319666_Analysis_of_secondary_metabolites_and_in_vitro_evaluation_of_extracts_of_Carica_papaya_and_Azadirachta_indica_leaves_on_selected_human_pathogens](https://www.researchgate.net/publication/340319666_Analysis_of_secondary_metabolites_and_in_vitro_evaluation_of_extracts_of_Carica_papaya_and_Azadirachta_indica_leaves_on_selected_human_pathogens)
38. Akpuaka A, Ekwenchi MM, Dashak DA, Ahmed D. Biological activities of characterized isolates of n-hexane extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. N Y Sci J. 1 de enero de 2013; 11:141-7. [Citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/309075776_Biological_activities_of_characterized_isolates_of_n-hexane_extract_of_Azadirachta_indica_Neem_leaves
39. Autade H, Saini S, Reddy P, Deorukhkar S, Padmajakshi G. Effect of Neem extract against opportunistic bacterial and fungal pathogens associated with AIDS. Int J Curr Microbiol App Sci. 1 de enero de 2015; 4:988-99. [Citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/305682946_Effect_of_Neem_extract_against_opportunistic_bacterial_and_fungal_pathogens_associated_with_AIDS
40. Swapna R, Pushpa S, Ramalashkmi K. Efficacy of Neem Kernel Bioactives Extracted using Supercritical Fluid Carbon Dioxide on Selected Dermatophytes and Foodborne Pathogens. Int J Innov Technol Explor Eng. 10 de noviembre de 2019; 9(1):4304-9. [Citado 13 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ijitee.org/wp-content/uploads/papers/v9i1/A4949119119.pdf>

ANEXOS

ANEXO N°1:

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Loyola Gil, Maricielo con DNI N° 70001766 a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en el presente trabajo son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 01 de junio del 2020

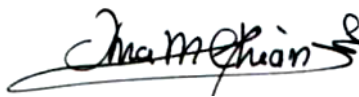
ANEXO N°2

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD DEL ASESOR

Yo, Ana María Chian García, docente de la Facultad de Ciencias médicas y Escuela Profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo de Trujillo, revisora del trabajo de investigación/tesis titulada “Efecto sinérgico antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* con el fluconazol sobre *Candida albicans* en estudio in vitro”, de la estudiante Maricielo Loyola Gil, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 29 % verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 01 de junio del 2020



Firma

Ana María Chian García

DNI: 17891784

ANEXO N° 3

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICAD ORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antifúngic o	Toda sustancia capaz de generar alguna modificación estructural a nivel celular de microorganismos fúngicos, logrando la inhibición de su desarrollo y dificultando su supervivencia, ya sea de manera directa o indirecta, contribuyendo así a su eliminación por el sistema inmunológico del huésped. ²⁹	Se dividió a la población en grupos: - Fluconazol 25 µg + extracto etanólico foliar de <i>Azadirachta indica</i> al 100% - Extracto etanólico foliar de <i>Azadirachta indica</i> al 100% - Fluconazol 25 µg - DMSO	RG1 RG2 RG3 RG4	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antifúngic o	Es la acción que ejerce cualquier agente físico, químico o biológico sobre especies fúngicas, eliminándolas (fungicida) o inhibiéndolas (fungistático). ²⁹	Se calculó el halo de inhibición, siguiendo los criterios del Estándar M44-A2 del CLSI. ³⁰ Efecto ≥19 mm No efecto <19 mm	Halo inhibitorio en milímetros	Cualitativa nominal

ANEXO N°4

MUESTRA

Se estimó mediante la fórmula estadística para comparación de dos medias, con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * 2 * S^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

$$Z_{\alpha/2} = 1.64$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

$$S = 0.71^{15}$$

$$X_1 = 33.00 \text{ mm promedio halo inhibitorio de Azadirachta indica}^{15}$$

$$X_2 = 31.70 \text{ mm promedio halo inhibitorio de fluconazol}^{22}$$

$$n = 3.67$$

Al redondear se obtiene 4 placas Petri, pero por recomendación de expertos se utilizarán 10 en total.

ANEXO N° 5

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

N° Repetición	HALO INHIBITORIO			
	Extracto etanólico foliar de <i>Azadirachta indica</i> al 100% + Fluconazol 25 µg	Extracto etanólico foliar de <i>Azadirachta</i> <i>indica</i> al 100%	Fluconazol 25 µg	DMSO
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Promedio				

Fuente: elaborado por autora.

ANEXO N°6



HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT)
Universidad Nacional de Trujillo
Nº: 60480
TRUJILLO - PERU

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT)
FLORA PERUANA

Familia: Meliaceae
Nombre Científico: *Azadirachta indica* A. Juss.
N. Vulgar: "nim", "neem"
Habitat: Árbol de ca. 6 m de alto, flores blancas, frutos amarillos
Procedencia: Chulucanas
Prov.: Morropón
Dpto./Región.: Piura
Habitat: Suelos negros arcilloso-arenosos, parque.
Altitud: 0 - 900 m s.n.m.
Colector: Leyola Gil, Maricelo
Fecha: 21/10/2020
Nº: 831

Familia de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina Humana, Universidad Cesar Valero, Trujillo.
Tesis: "Efecto sinérgico antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* con el fluconazol sobre *Candida albicans*. Estudio in vitro".

ANEXO N°7

TRATAMIENTO DE LAS HOJAS DE NEEM

- **Recolección de la planta y determinación taxonómica de la especie:** Se recolectaron hojas de Neem (*Azadirachta indica*) en el mercado local. La determinación taxonómica fue realizada por un biólogo botánico, quien evaluó el control de calidad.
- **Identificación:** Cuando se desea trabajar con materia vegetal con fines farmacológicos, se debe tener un control de calidad en el muestreo, es por ello que la planta fue evaluada por el biólogo a cargo del herbario Truxillense de la UNT para su taxonomía.
- **Preparación:** Se dejaron secar las hojas y la cantidad fue de 500 g. Luego fueron trituradas con un molinillo.
- **Selección de la muestra:** Se transportó la planta recolectada al laboratorio de Ciencias médicas de la UCV, donde se procedió a eliminar toda sustancia extraña que se encontraba presente.
- **Lavado de la planta:** Se lavó la planta con agua destilada, luego se procedió a desinfectarla utilizando NaClO al 0.5 %. Luego, se enjuagó la planta con agua destilada con el fin de retirar los residuos de NaClO.
- **Secado:** Luego del lavado de las hojas, se procedió a colocar la planta sobre papel Kraft, y se procedió a su secado a 40 °C.
- **Pulverización:** Se pulverizaron las hojas secas con un mortero.
- **Tamizaje:** Se pasó el material pulverizado por una serie de tamices hasta depurarlo completamente y tenga una consistencia homogénea.
- **Almacenamiento:** Se guardó el polvo obtenido de las hojas secas dentro de un frasco de vidrio ámbar.

Preparación del extracto etanólico foliar de neem

Se procedió a pesar 50 g del polvo obtenido a partir de las hojas secas de Neem y se almacenó en un contenedor de vidrio de 1000 mL, el cual se protegió de la luz recubriéndolo con papel aluminio. Posteriormente, se añadió el solvente que servirá para la extracción: etanol absoluto y se

maceró en agitación constante por una semana, obteniéndose así, extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica*.

Una vez terminado el proceso de maceración, se filtró tres veces el preparado. Para el primer filtrado se utilizó papel filtro Whatman N° 41, para el segundo y tercer filtrado se usó papel filtro Whatman N° 2 y N° 1, respectivamente. Una vez filtrado el extracto, se dejó secar en Rota vapor, consiguiendo así un extracto seco, para luego ser pesado y almacenado en papel aluminio. De esta forma, el extracto se encontró listo para ser utilizado.

Para preparar la concentración del extracto etanólico foliar de neem al 100% que se necesitó, se utilizó el extracto seco de las hojas de neem, al cual se le realizaron diluciones en etanol hasta obtener una concentración del 100%. Dicha dilución fue almacenada en un frasco herméticamente tapado y permaneció refrigerada hasta que fue necesaria.

Obtención de las cepas:

Se adquirió las cepas ATCC 10231 de *C. albicans* del laboratorio Genlab.

Preparación de las cepas:

Para preparar el inóculo se usaron las cepas ATCC 10231 de *C. albicans*, que tienen como característica la capacidad de multiplicarse en el agar Sabouraud en dos días aproximadamente. A continuación, se suspendieron las cepas en NaCl al 0.85% y se procedió a ajustar la turbidez del equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland para *C. albicans* por cámara cuenta-células, hasta lograr la cantidad de inóculo deseada (1×10^6 ufc/mL). Se corroboró a través de la sumatoria de diluciones en las cajas Petri. Antes de inocular con las cepas de *C. albicans* al medio agar Sabouraud, éste pasó por un proceso de reconstitución, esterilización y enfriado, además de haber sido mantenido a cuarenta y cinco grados centígrados. Una vez que el medio cumplió con dichas características, se procedió a inocular 1 mL de suspensión del inóculo (1×10^6 ufc/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, luego se homogenizó y distribuyó en las cajas esterilizadas de noventa

milímetros de diámetro, a razón de 20 mililitros por placa Petri. Se dejó reposar hasta solidificarse y se procedió a rotular las placas con el microorganismo usado como testigo. Por último, en cada una de las placas se acondicionaron dos o tres pozos equidistantes de 11 milímetros de diámetro.(26)

Prueba de susceptibilidad:

Se añadió 100 µL del respectivo extracto (1 mg/mL) de las distintas muestras en cada pozo, se dejaron en reposo por una hora a temperatura ambiente y luego se procedió a incubar a 37 °C por un día las cepas de *C. albicans*. En esta prueba se usaron como controles positivos, cepas expuestas a fluconazol (0,2 mg/mL) y como control negativo a cepas disueltas en DMSO (Dimetil sulfóxido), respectivamente. Posteriormente, se procedió a medir los halos inhibitorios, se recopilaron los resultados obtenidos y se consideró que tiene un efecto antifúngico significativo a una zona de inhibición mayor o igual a 19 milímetros. Para los procedimientos con *Candida albicans* se siguió el protocolo M60 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. (29)